

- tract cancers. *Oncol Rep* 1999;6:1051-1056
- 5 Ueki T, Fujimoto J, Suzuki T, Yamamoto H, Okamoto E. Expression of Hepatocyte growth factor and Its receptor c-met proto-oncogene in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997;25:862-866
- 6 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:2524-2529
- 7 Jiang WG, Lloyds D, Puntis MC, Nakamura T, Hallett MB. Regulation of spreading and growth of colon cancer cells by hepatocyte growth factor. *Clin Exp Metastasis* 1993;11:235-242
- 8 Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophysiol Res Comm* 1984;122:1450-1459
- 9 Vila MR, Nakamura T, Real F. Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for normal human pancreas cells *in vitro*. *Lab Invest* 1995;73:409-418
- 10 Rosen EM, Meromsky L, Setter E, Vinter DW, Goldberg ID. Purified scatter factor stimulates epithelial and vascular endothelial cell migration. *Proc Soc Exp Biol Med* 1990;195:34-43
- 11 Brinkmann V, Foroutan H, Sachs M, Weidner KM, Birchmeier W. Hepatocyte growth factor /scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J Cell Biol* 1995;131:1573-1586
- 12 Zhang YW, Vande Woude GF. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J Cell Biochem* 2003;88:408-417
- 13 Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA. Identification of the hepatocyte growth factor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 1991;251:802-804
- 14 Webb CP, Taylor GA, Jeffers M, Fiscella M, Oskarsson M, Resau JH, Vande Woude GF. Evidence for a role of met-HGF/SF during Ras-mediated tumorigenesis/metastasis. *Oncogene* 1998;17:2019-2025
- 15 Parr C, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. The hepatocyte growth factor regulatory factors in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(1 Pt 1):202-11

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

## 直肠癌旁移行黏膜中 Survivin 基因表达的意义

苏 琪, 吴硕东, 殷红专, 韩 霞, 陈春生, 冯 勇, 刘恩卿

苏琪, 吴硕东, 殷红专, 韩霞, 陈春生, 冯勇, 刘恩卿, 中国医科大学第二临床学院普外四科 辽宁省沈阳市 110004

辽宁省自然科学基金资助项目: No. 972255

项目负责人: 苏琪, 110004, 辽宁省沈阳市和平区三好街 36 号, 中国医科大学第二临床学院普外四科. suqi100@hotmail.com

电话: 024 - 83955072

收稿日期: 2004-05-07 接受日期: 2004-06-17

### 摘要

目的: 探讨凋亡抑制基因survivin在直肠癌旁移行黏膜中的表达情况, 为保肛手术的选择提供理论依据。

方法: 应用黏液组化方法确定各种组织类型直肠癌旁移行黏膜的分布规律, 应用免疫组织化学方法检测凋亡抑制基因survivin在直肠癌旁移行黏膜中的表达情况。

结果: 直肠癌旁移行黏膜范围, 在黏液癌(平均 7.83 cm)明显大于乳头状癌及管状腺癌( $P < 0.01$ ), 在Dukes C期(平均 5.61 cm)明显大于Dukes A、B 期( $P < 0.05$ )。正常黏膜(NM)、移行黏膜(TM)、非典型增生及癌组织中均有survivin基因产物表达, 由正常直肠黏膜到癌组织表达率逐渐增加, 四组间差别有显著意义( $P < 0.05$ )。

结论: 在移行黏膜(TM)、非典型增生及癌组织中就存在survivin基因表达上调; 在黏液癌及Dukes C期直肠癌旁移行黏膜范围明显增宽, 提示对低位黏液癌及Dukes C期直肠癌保肛手术应慎重。

苏琪, 吴硕东, 殷红专, 韩霞, 陈春生, 冯勇, 刘恩卿. 直肠癌旁移行黏膜中Survivin基因表达的意义. 世界华人消化杂志 2004;12(9):2201-2202

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2201.asp>

### 0 引言

Survivin 是凋亡抑制基因(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员。近年来, 对 survivin 的分子生物学, 凋亡抑制机制及其与肿瘤发展关系的研究已取得一定进展。随着保肛手术逐渐增加, 特别是腹腔镜等微创技术在直肠癌中的应用, 根治术后 2 a 内局部复发有逐年增加的趋势, 其中吻合口复发者占 5-15%。所以癌旁移行黏膜(transitional mucosa, TM)的研究更加受到重视<sup>[1-2]</sup>。我们率先将凋亡抑制基因 survivin 应用于直肠癌旁 TM 的研究, 并与正常黏膜及癌组织进行对照如下。

### 1 材料和方法

1.1 材料 2000/2003 年手术切除的直肠癌标本 73 例, 男 41 例, 女 32 例; 年龄  $53.0 \pm 12.3$  岁。乳头状腺癌 32 例, 管状腺癌 23 例, 黏液腺癌 16 例, 未分化癌 2 例。Survivin 羊抗人多克隆抗体(sc-8806)为 Santa Cruz 公司产品、survivin 一抗工作浓度为 1:50, SP 试剂盒为 Zymed 公司产品, 高铁双胺奥蓝(HID-AB)试剂盒购于上海虹桥医用试剂研究所。

1.2 方法 标本经 40 g/L 的中性甲醛固定后, 沿肠管纵向自癌肿向两端每 0.5 cm 等长取材, 近端平均距癌瘤

20 cm, 远端4.5 cm, 石蜡包埋, 制成5  $\mu\text{m}$  厚切片. 每例切片均作HID-AB黏液染色, 免疫组化染色, 用PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照, 用已知阳性切片作为阳性对照. 直肠癌标本均由手术病例证实. 临床病理分期按Dukes分期, 组织学分类、分期参照全国大肠癌协会统一标准, 有两名病理学教授分别阅片. HID-AB黏液染色采用Filipe标准<sup>[1]</sup>, 正常黏膜腺管杯状细胞内出现黑色的硫酸粘蛋白, 而TM则腺体中超过50%杯状细胞中出现蓝色唾液酸粘蛋白染色. 免疫组化S-P染色: 凡染色强度明显高于背景者为阳性表达, 将阳性细胞按数量及染色强度分为3级: 表达弱阳性(+), 即阳性细胞数小于10%; 表达强阳性(+++), 即阳性细胞数占60%以上; 中强度阳性(++), 即阳性细胞数介于以上二者之间; 染色强度与背景一致者为阴性.

**统计学处理** 计量资料采用 *t* 检验; 计数资料采用 $\chi^2$  分析.

## 2 结果

**2.1 黏液组化染色结果** 73例直肠癌中有70例检出了癌旁移行黏膜, 检出率95.8%, 癌旁TM分布范围0-12.3 (平均3.14) cm, 其中52例(71%)局限在癌旁3 cm范围内. 黏液腺癌旁TM分布最广, 平均 $7.83 \pm 1.36$  cm, 明显大于乳头状腺癌( $1.08 \pm 1.36$ )及管状腺癌( $2.13 \pm 1.91$  cm  $P < 0.01$ ). Dukes分期越晚, 其相应癌旁TM分布越广, DukesC期( $5.61 \pm 4.52$  cm)明显大于DukesA、B期( $1.05 \pm 0.84$  和  $2.70 \pm 2.60$  cm  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ).

**2.2 免疫组化染色结果** 正常黏膜(NM)、移行黏膜(TM)、非典型增生及癌组织中均有 survival 基因产物表达, 由正常直肠黏膜到癌组织表达率逐渐增加, 4组间差别有显著意义( $P < 0.05$ ). 在癌组织及癌旁组织, survival 基因产物均位于细胞质, 未见细胞核及细胞膜阳性, 阳性细胞成弥漫性、局灶性或散在性分布. 60例 survival 阳性的直肠癌病例中, TM平均范围3.8 cm, 13例 survival 阴性的直肠癌病例中TM平均范围1.2 cm, 二者间差异有显著意义( $P < 0.05$ )(表1).

## 3 讨论

Survivin是凋亡抑制基因(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员. Survivin的结构较为独特, 他仅含有单一的BIR功能区, 没有指环结构, 是一个142个氨基酸

的蛋白. Survivin和EPR-1位于染色体(17q25)的同一基因组, 长度范围在75-130 kb, 他们分别由不同的mRNA(1.9 kb和1.3 kb)所编码. Survivin表达于人与鼠的胚胎发育组织, 但在正常成人组织很少表达<sup>[3-5]</sup>. 研究表明 survivin 是迄今发现最强的凋亡抑制因子<sup>[5]</sup>. Caspase是细胞凋亡的核心机制, 其级联式激活并溶解蛋白质, 决定了凋亡形态的变化<sup>[7]</sup>. Survivin直接作用于Caspase, 主要抑制Caspase-3, Caspase-7的活性, 阻断细胞的凋亡过程. 另外 survivin 也可以通过p21间接抑制Caspase, 其机制是 survivin 与细胞周期调控因子CDK4形成survivin-CDK4复合体, 使得p21从CDK4的复合体中释放出来, p21进一步与线粒体Caspase3结合, 抑制其活性, 阻止细胞凋亡<sup>[3-5]</sup>.

近几年来, 对 survivin 的分子生物学, 凋亡抑制机制及其与肿瘤发展, 血管形成, 细胞周期关系的研究正引起国外学者的广泛关注. 但目前尚未见到将其用于癌旁移行黏膜的研究. 我们应用黏液组织化学方法观察了直肠癌旁TM的分布情况. 应用免疫组织化学的方法研究人原发性直肠癌旁TM中survivin基因产物的表达, 此方法具有简便、快速等特点且能够观察 survivin 基因产物在良恶性细胞中的定位. 结果显示在癌旁正常黏膜 survivin 基因产物阳性表达最低(9.38%), 在移行黏膜、非典型增生、癌组织(79.45%)逐渐增高, 4组间差异有显著意义( $P < 0.05$ ). 提示该基因对直肠癌的发生发展起重要作用, survivin 基因有望成为直肠癌基因治疗的新靶点.

在survivin基因产物表达阳性的直肠癌病例中, TM范围大于 survivin 阴性的病例( $P < 0.05$ ), 表明 survivin 基因的增加可能是导致癌旁移行性变化的因素之一. 在直肠癌的发生过程中, 从TM开始就有 survivin 基因产物的表达上调, 表明survivin基因增加与直肠癌的发生有关, 可作为判断肿瘤发生可能性的有用标志物, 并提示TM具有一定的恶性潜能. 为此, 在直肠癌微创及保肛手术时, 应该彻底切除癌旁TM, 以减少局部复发率, 提高生活质量. 直肠癌 survivin 基因产物表达上调与TM的范围之间存在一定相关性, 其具体机制有待分子生物学深入研究.

## 4 参考文献

- 1 苏琪, 王宇令, 刘恩卿, 陈春生, 冯勇, 王伟, 李冠群, 彭春辉. 直肠癌旁移行黏膜变化规律及其临床意义. 中国肛肠病杂志 2000;20:3-5
- 2 谢正勇, 卿三华. 国人青年结直肠癌解剖部位分布及临床病理特点. 世界华人消化杂志 2003;11:1511-1514
- 3 Ambrosini G, Adida C, Sirugo G, Altieri DC. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting. *J Biol Chem* 1998;273:11177-11182
- 4 Adida C, Crotty PL, Mograth J, Berrebi D, Diebold J, Altieri DC. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 1998;152:43-49
- 5 Suzuki A, Ito T, Kawano H, Hayashida M, Hayasaki Y, Tsutomi Y, Akahane K, Nakano T, Miura M, Shiraki K. Survivin initiates procaspase 3/P21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death. *Ncogene* 2000;19:1346-1353

表1 Survivin 基因产物在直肠癌及癌前状态的表达

上皮类型	n	阴性	弱阳性	阳性	强阳性	阳性率 %
正常粘膜	32	29	2	1	0	9.38
移行粘膜	70	47	12	8	3	32.86
非典型增生	21	12	4	3	2	42.86
癌	73	15	20	18	20	79.45

$\chi^2$  检验  $\chi^2_{0.05(3)} = 10.23 P < 0.05$ .